

На правах рукописи

МИРОНОВ НИКОЛАЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ПАРОВ
ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СМЕСЕЙ β -ЛАКТОГЛОБУЛИНОМ
И ПОЛИ-N-6-АМИНОГЕКСИЛАКРИЛАМИДОМ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2004

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина”.

Научный руководитель:	доктор химических наук, профессор, Горбачук Валерий Виленович
Официальные оппоненты:	доктор химических наук, профессор, Маленков Георгий Георгиевич кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Зуев Юрий Федорович
Ведущая организация:	Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук

Защита состоится “28” октября 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.03 в Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, научная часть.

Автореферат разослан “_____” сентября 2004 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета Д 212.081.03
кандидат химических наук

Казымова М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Термодинамическое изучение кооперативного влияния гидратации на рецепторные свойства твердых белков и гидрофильных полимеров, а также факторов, влияющих на этот процесс, позволяет глубже понять роль воды в способности белков связывать субстраты и выявить важные критерии, которым должны удовлетворять полимерные рецепторы для того, чтобы их рецепторные свойства были биоподобны. Знание этих критериев необходимо для молекулярного дизайна биоподобных и биосовместимых полимеров, применяемых в качестве сенсоров, а также для транспорта лекарств и создания искусственных тканей в медицинских целях. Кооперативные эффекты с участием воды известны для кинетики ферментативных реакций, для связывания белками воды из водно-органических смесей, а также для термотропных фазовых переходов гидрофильных полимеров и процессов сворачивания белков в нативную структуру. Большая часть этих данных получена для растворов, из-за чего их интерпретация существенно затруднена доминирующим вкладом дегидратации субстрата перед его связыванием белком или полимером. Данные о влиянии внешних факторов (температура и присутствие примесей) на кооперативный эффект гидратации для белков в отсутствие жидкой фазы и о существовании аналогичного кооперативного эффекта для полимеров в литературе отсутствуют.

Цель работы. Целями диссертационной работы являлось:

- установление закономерностей кооперативного влияния гидратации на сорбционные свойства стеклообразного гидрофильного сшитого полимера с целью оценки степени биоподобности его рецепторных свойств
- изучение влияния температуры и примесей липидов на кооперативный эффект гидратации при связывании белком углеводов

Научная новизна и выносимые на защиту положения. В диссертационной работе впервые обнаружен биоподобный кооперативный эффект при связывании паров органических соединений сшитым гидрофильным полимером. Показано, что с ростом гидратации его сродство к гидрофобным и относительно крупным гидрофильным сорбатам, так же как и в случае белков, кооперативно возрастает и достигает насыщения.

Впервые обнаружено, что увеличение температуры от комнатной (298 К) до физиологической приводит к уменьшению порога по гидратации, выше которого происходит эффективное связывание субстратов белком. Впервые обнаружен синергизм во влиянии гидратации и примесей липидов, присутствующих в белке, на его сорбционное сродство. Показано, что данный эффект не связан с растворением сорбатов в отдельной фазе липидов.

Практическая значимость работы состоит в том, что на основании ее результатов становится возможным выявление структурных крите-

риев, необходимых для молекулярного дизайна полимеров, обладающих биоподобными рецепторными свойствами, с целью создания на их основе сенсоров, не уступающих по селективности и чувствительности сенсорам на основе белков. Данные о влиянии липидов и температуры на рецепторные свойства белка обеспечивают фундаментальную основу для решения проблем распознавания запахов в биологических системах, удерживания ароматических добавок и вредных веществ пищевыми продуктами.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались на I, II и III Научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ (Казань, 2000, 2001 и 2003 гг.), на итоговых конференциях КГУ (Казань, 2002 и 2003 гг.), на XIV Международной конференции по химической термодинамике (Санкт-Петербург, 2002 г.), на II Международном симпозиуме “Молекулярный дизайн и синтез супрамолекулярных архитектур” (Казань, 2002 г.), на II Междисциплинарной конференции НБИТТ-21 (Петрозаводск, 2003), на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003 г.), на II Международном симпозиуме “Реагирующие полимеры в негомогенных системах в расплавах и на межфазных границах” (Дрезден, Германия, 2003 г.).

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина” под руководством доктора химических наук В.В. Горбачука при поддержке гранта УРФИ (проект N 015.05.01.16), совместного гранта CRDF и Российского Министерства образования “Basic Research & Higher Education” (REC-007), РФФИ-тат. (No.03-03-96188) и АНТ (No.7-7.1-60/2001 и No.7-7.3-209/2003).

Личный вклад автора. Автором диссертации было выполнено 90% экспериментальной работы. Доля участия автора при написании статей - 30% от объема публикации, при написании тезисов конференций – 50%.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи и тезисы 10 докладов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и содержит 43 рисунка и 32 таблицы. Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, экспериментальная часть, обсуждение результатов), выводов, списка литературы из 112 наименований и приложения.

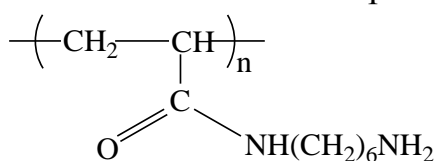
В первой главе собраны и систематизированы литературные данные о термодинамике взаимодействий белков и полимеров с органическими соединениями и водой из паровой фазы и из растворов. Приводятся литературные данные об известных кооперативных эффектах, наблюдаемых для белков и полимеров. Обсуждаются различные сорбционные модели, созданные для описания сорбции на белках и полимерах. Во второй главе описаны объекты исследования и экспериментальные методики, приме-

нявшиеся в ходе выполнения настоящей работы. В третьей главе обсуждаются полученные экспериментальные данные. Для двухкомпонентных систем проводится анализ влияния температуры и примесей липидов на сорбционные свойства высушенного белка, и анализируются биоподобность высушенного сшитого гидрофильного полимера путем сравнения его сорбционных свойств со свойствами ранее изученных белков. Для трехкомпонентных систем анализируется сходство кооперативного влияния гидратации на рецепторные свойства белков и изученного полимера, обсуждается влияние температуры и примесей липидов на кооперативный эффект гидратации. Кроме того, сопоставляется влияние “водоподобных” органических растворителей на сорбционные свойства полимера и белка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования и метод измерения

В качестве объектов исследования были выбраны твердые белки β -лактоглобулин (БЛГ) из коровьего молока (Armor Proteines), коллаген из бычьих сухожилий (Sigma) и гидрофильный синтетический сшитый полимер поли-N-6-аминогексилакриламид (ПНАГАА) (Aldrich):



Полимер, имевший форму гранул со средним диаметром 100 μm , изучался без дополнительной очистки. Препарат БЛГ, содержащий 75 масс. % β -лактоглобулина, 15% других белков, 0.6% лактозы и 1.2% липидов (в основном жиров и жирных кислот), исследовался в двух состояниях: без предварительной очистки и после удаления липидов хлороформом при комнатной температуре. Коллаген изучался только в обезжиренном состоянии. Согласно данным ИК-спектроскопии, полосы поглощения амида I и амида II в спектре обезжиренного БЛГ и препарата, содержащего примеси липидов, совпадали, что свидетельствует об отсутствии необратимой денатурации белка при обезжиривании в данных условиях.

В качестве сорбатов использовались терпены α - и γ -терпинен (Aldrich) (>97% основного компонента), терпинолен (Fluka) (>90%) и различные органические растворители, отличающиеся размером, формой и групповым составом молекул (степень чистоты >99%).

Сорбция органических соединений в двух- и трехкомпонентных системах изучалась статическим методом парофазного газохроматографического анализа. Время, необходимое для достижения сорбционного равновесия после дозирования сорбатов и зависящее, главным образом, от скорости испарения сорбатов, составляло 3-11 дней. Активность сорбата определялась как отношение высоты хроматографического пика в системах с сорбентом к высоте пика над чистым растворителем.

Степень осушки белков и полимера перед дозированием сорбатов определялась с помощью микротермогравиметрического анализатора MGD TD-17S (SETARAM). Погрешность определения гидратации сорбентов составляет 0.002 г H₂O/г сорбента (0.002 h).

Влияние температуры и примесей липидов на сорбцию органических соединений высушенным β -лактоглобулином

Изотермы сорбции ацетонитрила и декана на высушенном жирном, (1.2 масс. % липидов) и высушенном обезжиренном β -лактоглобулине (остаточная гидратация 0.05 h), полученные при различных температурах, показаны на рис. 1. Изотермы сорбции представляют собой зависимость состава твердой фазы A от активности сорбата в системе P/P_0 . Полученные изотермы сорбции были формально аппроксимированы с помощью известных в литературе моделей.

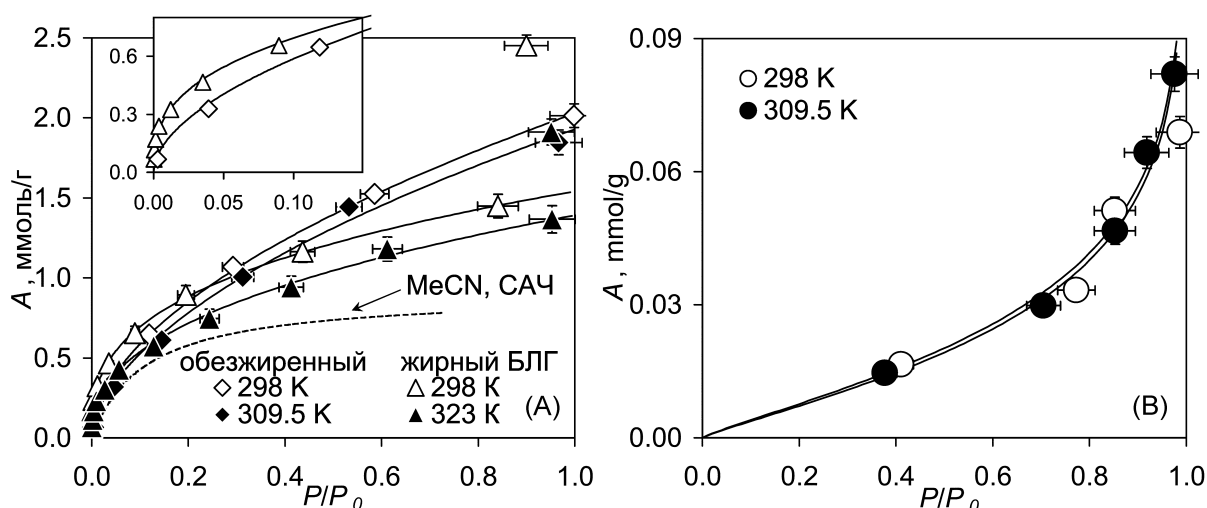


Рис. 1. Изотермы сорбции ацетонитрила высушенным жирным (1.2 масс. % липидов) и обезжиренным β -лактоглобулином (БЛГ) (0.05 h). На вставке приведен увеличенный фрагмент изотермы сорбции ацетонитрила. Здесь и далее, данные для сывороточного альбумина человека (САЧ) взяты из работ V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin, B.N. Solomonov *Biophys.Chem.* **1999**, *81*, 107-123 и V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin, B.N. Solomonov, M. D. Borisover *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 901-907.

Изотермы сорбции ацетонитрила, полученные как для жирного, так и обезжиренного БЛГ, имеют схожую форму с аналогичными данными для сывороточного альбумина человека (САЧ) (0.01 h, содержание липидов 0.2%), рис. 1А. Сорбция декана на высушенном БЛГ была обнаружена только для белка, содержащего примеси липидов, рис. 1В. Это согласуется с полученными ранее данными для практически не содержащего жиров высушенного САЧ, который оказался неспособным связывать моnofункциональные органические соединения, молярный объем которых превышал 80 мл/моль (молярный объем декана – 195 мл/моль). Высокая селективность

БЛГ к паре ацетонитрил/декан опровергает предположение о существенной сорбции на поверхности раздела белок - газ и согласуется с имеющимся в литературе мнением о том, что сорбция воды и малых органических молекул осуществляется в объеме твердой фазы белка.

Увеличение температуры от 298 К до физиологической 309.5 К и далее до 323 К приводит к падению сорбции ацетонитрила высушенным β -лактоглобулином, рис. 1А, что согласуется с литературными данными по влиянию температуры на сорбцию воды белками. Изотермы сорбции декана на высушенном БЛГ с примесями жиров при температурах 298 К и 309.5 К практически совпадали, рис. 1В.

Липиды довольно сложным образом влияют на связывание ацетонитрила высушенным БЛГ, увеличивая его при активностях сорбата до 0.2, рис. 1А (вставка), и уменьшая при активностях ацетонитрила выше 0.4, рис. 1А. Подобный эффект липидов был бы невозможен, если бы они существовали в белке в виде отдельной фазы. Анализ коэффициентов активностей декана и ацетонитрила в фазе липидов, экстрагированных из БЛГ, показал, что существованием отдельной фазы липидов можно объяснить сорбцию 70% добавленного декана (при $P/P_0 = 0.18$) и всего 0.3% увеличения сорбции ацетонитрила (при $P/P_0 = 0.026$) за счет присутствия в белке липидов. Из этого следует, что, по крайней мере, часть липидов не образует в белке отдельную фазу.

Влияние температуры и примесей липидов на сорбционные свойства гидратированных β -лактоглобулина и коллагена

Влияние гидратации, температуры и примесей липидов на сорбционное сродство БЛГ к декану и терпенам изучалось в системах "белок + вода + этанол + углеводород" в отсутствие жидкой фазы. Объемное соотношение жидких углеводорода, этанола и воды, дозируемых на БЛГ, составляло 0.9 : 9.0 : 90.1. В случае систем с коллагеном, дозируемый раствор состоял из воды (94 об. %) и диоксана (6%). Доля органических компонентов была выбрана такой, чтобы, с одной стороны, свести к минимуму их влияние на сорбцию воды белком, а с другой, чтобы они имели достаточно высокую активность. Этанол использовался в качестве разбавителя углеводорода для уменьшения ошибки дозирования, и его влияние на сорбционное сродство БЛГ к углеводородам не превышало 5%. Изотермы сорбции терпенов, декана и этанола на БЛГ, а также диоксана на коллагене приведены на рис. 2 и 3 в координатах: отношение количества связанного сорбата к его активности $A/(P/P_0)$ против гидратации белка, h . Величина $A/(P/P_0)$ представляет собой сорбционное сродство белка или коэффициент распределения сорбата между его чистой жидкостью и фазой белка. Сложные формы изотерм сорбции изученных сорбатов на гидратированном β -лактоглобулине не позволили подобрать уравнение для их аппроксимации. Изотермы сорбции диоксана на коллагене были аппроксимированы моди-

фицированным уравнением Хилла, предложенным более 100 лет назад для описания кооперативной сорбции кислорода растворенным в воде гемоглобином.

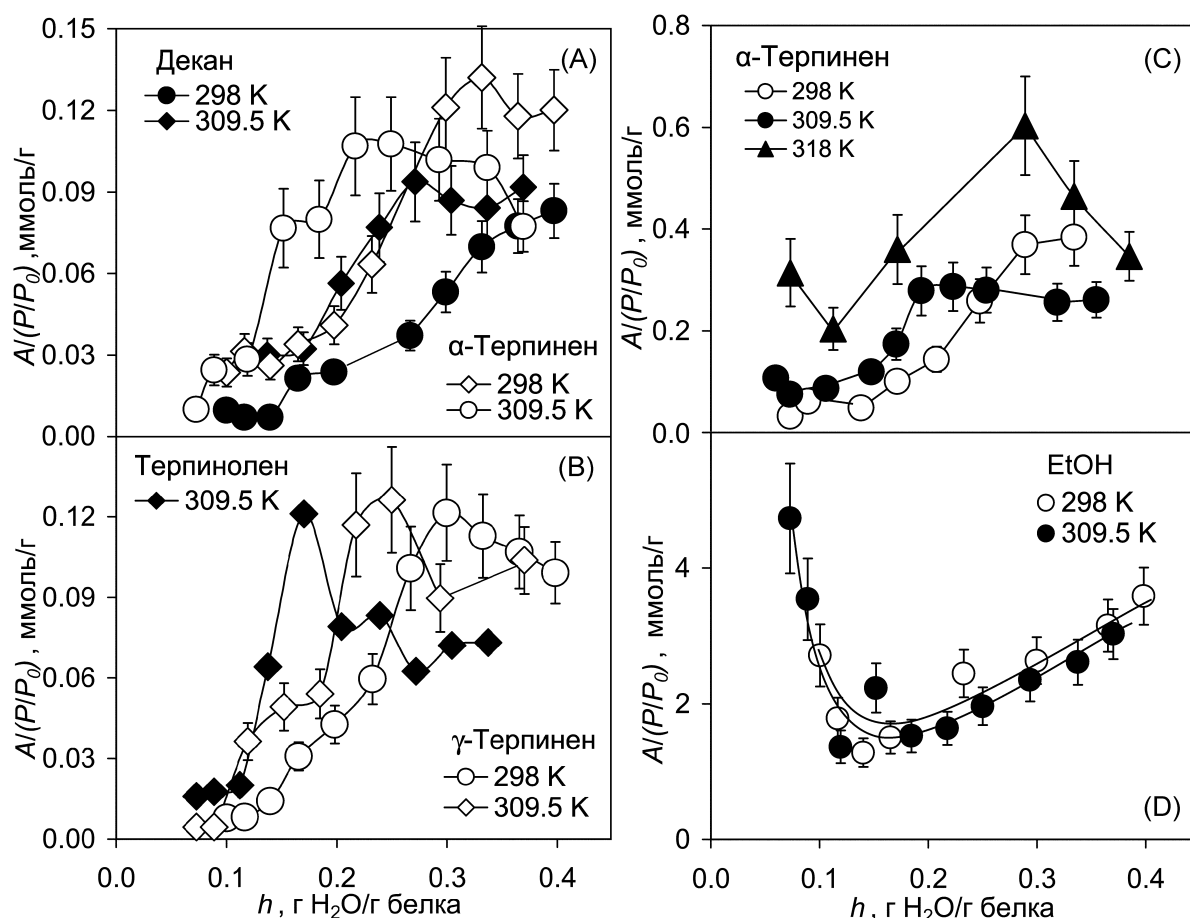


Рис. 2. Влияние гидратации и температуры на сорбционное сродство $A/(P/P_0)$ обезжиренного (А, В и D) и жирного (С) β -лактоглобулина к углеводородам и этанолу в четырехкомпонентных системах при 298, 309.5 и 318 К. Объемное соотношение углеводорода, воды и этанола в дозируемой жидкой смеси 0.9 : 90.1 : 9.0, соответственно.

Из представленных рис. 2 и 3 изотерм видно, что влияние гидратации на сорбционное сродство БЛГ к углеводородам и коллагена к диоксану существенно отличается от ее влияния на сродство БЛГ к этанолу. Для углеводородов наблюдается ступенчатая изотерма с порогом по гидратации белков, выше которого происходит кооперативный рост их сорбционного сродства к сорбатам с выходом на максимум или насыщение, рис. 2 и 3. В случае этанола сорбционное сродство сначала падает, а затем немного возрастает, рис. 2D. Аналогичная зависимость формы изотермы сорбции от размера сорбата была ранее обнаружена при изучении сорбции парообразных двухкомпонентных систем “вода + органический растворитель” (соотношение компонентов 94:6, соответственно) на САЧ. Присутствие в БЛГ примесей липидов не сказывается на форме изотерм сорбции, рис. 2С. Причиной ступенчатой зависимости сродства белка от его гидратации яв-

ляется клатратообразование в тройных системах “белок + вода + органический компонент”, сопровождаемое фазовым переходом белка при достижении пороговой гидратации. В литературе имеются модельные представления и сведения о клатратообразовании в системах подобного типа, полученные методом РСА.

Повышение температуры от 298 К до физиологической не влияет, в пределах ошибки эксперимента, на величину максимального сорбционного сродства изученных белков, но уменьшает порог по гидратации (степень гидратации, соответствующая увеличению сродства белка наполовину) на 0.03-0.08 h как для жирного и обезжиренного БЛГ, так и для коллагена, рис. 2А-С и 3. Причиной этого может быть то, что белку для связывания углеводов требуется достижение определенной активности, а не содержания воды. Эта интерпретация соответствует современным представлениям о влиянии воды на кинетику ферментативных реакций. При увеличении температуры до 318 К происходит возрастание порога по гидратации, что вызвано, по всей видимости, денатурацией белка, рис. 2С. Сродство гидратированного БЛГ к этанолу, присутствовавшему в этих же системах, практически не зависит от изменения температуры, рис. 2D.

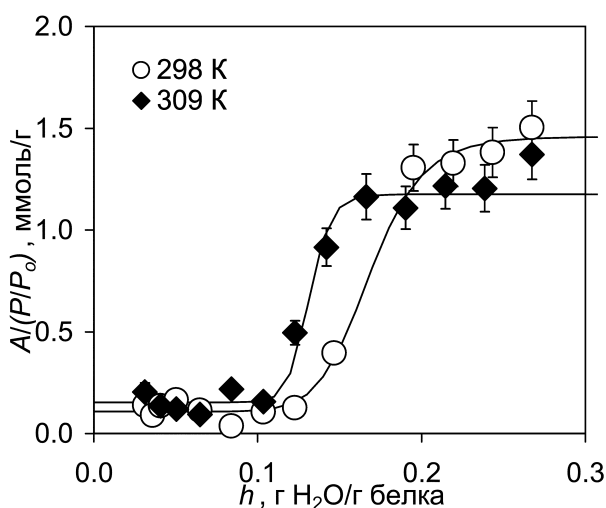


Рис. 3. Влияние гидратации на сорбционное сродство $A/(P/P_0)$ обезжиренного коллагена к диоксану в трехкомпонентных системах с водой при 298 и 309 К. Объемное соотношение компонентов добавляемой жидкой смеси диоксана и воды составляет 6 : 94.

Присутствие в гидратированном БЛГ всего 1.2 % примесей липидов более чем вдвое увеличивает его сродство к изученным углеводородам и этанолу при гидратациях выше пороговой, рис. 2С (для этанола данные не показаны). При этом экспериментальное значение сорбционного сродства жирного гидратированного БЛГ оказывается в несколько раз выше, чем рассчитанное по аддитивной схеме “сродство жирного высушенного БЛГ + сродство гидратированного обезжиренного БЛГ”. На основании данных о коэффициентах активностей изученных сорбатов в экстрагированных из БЛГ липидах, были рассчитаны количества этих сорбатов, способные раствориться в отдельной фазе липидов в БЛГ, если таковая существует. Они оказались в несколько раз ниже, чем наблюдаемый прирост сорбционной емкости гидратированного БЛГ за счет присутствия липидов. Это свидетельствует о наличии синер-

гизма во влиянии гидратации и примесей липидов на рецепторные свойства БЛГ.

Сорбционные свойства высушенного сшитого поли-N-6-аминогексил-акриламида

Изотермы сорбции паров органических растворителей на высушенном поли-N-6-аминогексил-акриламиде (ПНАГАА) (остаточная гидратация 0.015-0.066 h) при 298 К представлены на рис. 4 как зависимость сорбции A изученных сорбатов от их термодинамической активности P/P_0 . Высушенный полимер не связывает циклогексан. Сорбция бензола и этилацетата лишь ненамного превышает величину экспериментальной ошибки.

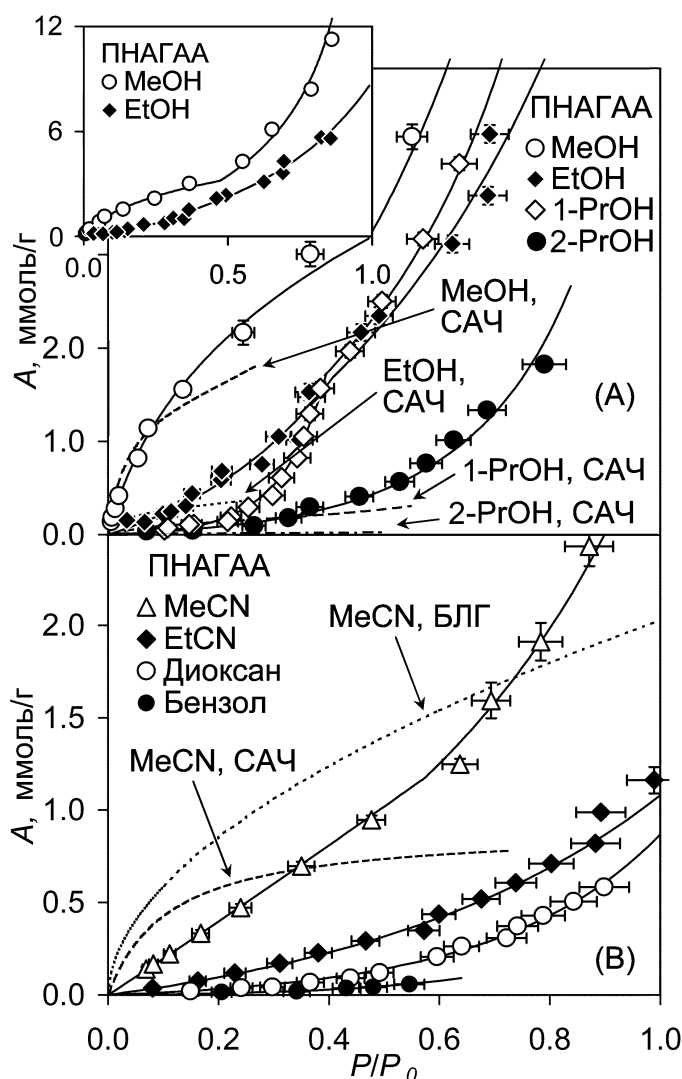


Рис. 4. Изотермы сорбции паров органических соединений высушенным ПНАГАА (0.015-0.066 h) при 298 К. Данные для БЛГ (0.05 h) взяты из рис. 1А, а для САЧ (0.01 h) - из литературы (см. подпись к рис.1).

Форма полученных изотерм сорбции (рис. 4) типична для стеклообразных полимеров. На изотермах сорбции соединений с наименьшим размером молекул (метанол и ацетонитрил) при низких активностях наблюдается выпуклый лэнгмюровский участок, обусловленный их сорбцией в так называемом свободном объеме полимера. Точка перегиба на этих изотермах отвечает переходу полимера из стеклообразного в резиноподобное (высокоэластичное) состояние. Изотермы сорбции более крупных

сорбатов (2-пропанол, пропионитрил, диоксан, бензол), размер которых не позволяет им проникнуть в свободный объем полимера без его пластификации, имеют вогнутую форму во всем интервале активностей. Изотермы более сложной формы, состоящие из двух вогнутых участков, наблюдаются для 1-пропанола и, в меньшей степени, этанола. Возможная причина этого – наличие кооперативного перехода в стеклообразном полимере в

процессе связывания сорбата. Полученные изотермы сорбции были аппроксимированы с помощью известных в литературе моделей.

В отличие от ПНАГАА, на изотермах сорбции для высушенных белков САЧ (лит. данные) и БЛГ имеется лэнгмюровский участок при низких активностях всех изученных сорбатов, рис. 4. Кроме того, изотермы сорбции ацетонитрила на БЛГ и САЧ, не имеющие точек перегиба, рис. 4В, а также литературные данные, свидетельствуют о том, что белки, в отличие от ПНАГАА, сохраняют стеклообразное состояние при высоких активностях органических растворителей.

Для ПНАГАА и ранее изученного САЧ при низких активностях сорбатов ($P/P_0 < 0.2$) наблюдается практически одинаковый эффект исключения сорбатов по объему: их сорбционное сродство резко падает с ростом размеров молекул сорбата в изученных гомологических сериях спиртов и нитрилов, рис. 4. Но при высоких активностях сорбатов ($P/P_0 > 0.4$) ПНАГАА гораздо менее селективен к размеру их молекул, чем альбумин, что вызвано более высокой пластификацией полимера при сорбции изученных органических растворителей. Однако эта пластификация является довольно ограниченной, поскольку ПНАГАА, так же как и альбумин, лучше сорбирует 1-пропанол, чем 2-пропанол даже при высоких активностях сорбатов. Жидкие растворители имеют обратную селективность к этой паре сорбатов.

Наблюдаемый при низких активностях сорбатов, когда ПНАГАА еще сохраняет стеклообразное состояние, сильный эффект исключения сорбатов по объему, свидетельствует о том, что стеклообразный ПНАГАА обладает сорбционными свойствами, близкими к белковым. Это позволяет ожидать для него наличие биоподобного кооперативного влияния гидратации на его рецепторные свойства.

Влияние гидратации на сорбционное сродство ПНАГАА к парообразным органическим соединениям

Для оценки биоподобности рецепторных свойств поли-N-6-аминогексилакриламида был изучено влияние гидратации на сорбционное сродство ПНАГАА к парообразным сорбатам в тройных системах “полимер + вода + органический сорбат” в отсутствие жидкой фазы. Дозируемая в ампулы с осушенным полимером жидкая смесь содержала 6 об. % органического соединения и 94 % воды. Полученные изотермы сорбции показаны на рис. 5 как зависимость сорбционного сродства ПНАГАА $A/(P/P_0)$ от его гидратации h . Для сравнения также приведены изотермы сорбции для гидратированного САЧ в тех же системах.

Из сравнения рис. 2, 3 и 5А видно, что, так же как и в случае с САЧ и БЛГ, изотермы сорбции наименьших по размеру сорбатов этанола и ацетонитрила в присутствии паров воды существенно отличаются по форме от изотерм сорбции более крупных соединений. Гидратация лишь незначи-

тельно увеличивает сродство ПНАГАА к этанолу и ацетонитрилу. В то же время с ростом гидратации ПНАГАА для более крупных сорбатов наблюдается такой же кооперативный рост его сорбционного сродства с выходом на насыщение, что и в случае белков БЛГ, коллагена и ранее изученного САЧ. При этом максимальное сходство в форме изотерм сорбции для ПНАГАА и САЧ наблюдается в трехкомпонентных системах с диоксаном и бензолом, которые являются наихудшими пластификаторами ПНАГАА среди изученных растворителей. Пропанола, чья способность пластифицировать ПНАГАА выше, чем у диоксана с бензолом, но ниже, чем у ацетонитрила и этанола, занимают промежуточное положение по степени сходства в форме изотерм сорбции для гидратированного полимера и белка, рис. 5В.

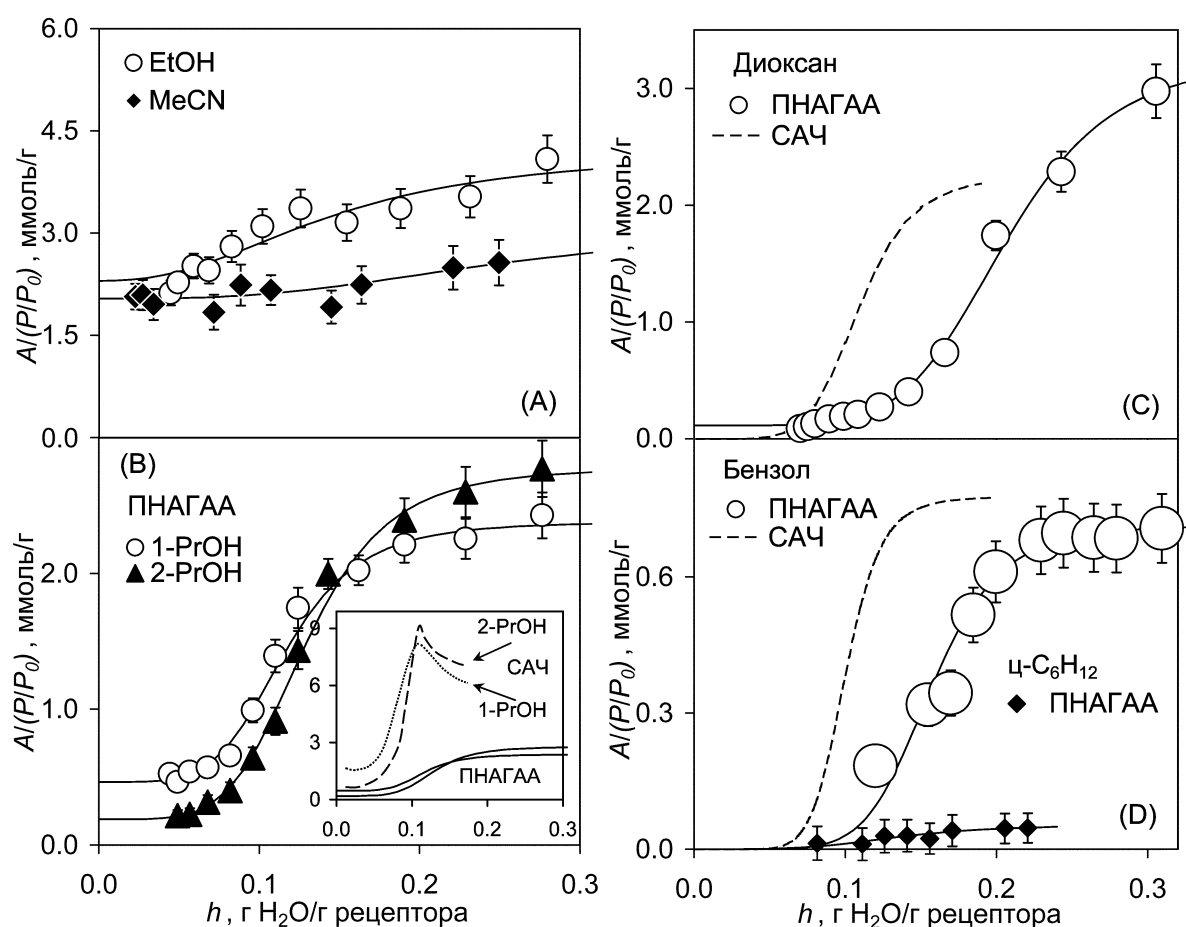


Рис. 5. Влияние гидратации на сорбционное сродство $A/(P/P_0)$ ПНАГАА к парам органических соединений при 298 К. Содержание органического компонента в дозируемой жидкой водно-органической смеси, добавленной к предварительно осушенному полимеру, составляет 6 об. %. Пунктирные линии представляют собой изотермы сорбции для САЧ (лит. данные). На вставке рис. 5В сопоставлена сорбция пропанолов на САЧ и ПНАГАА.

Полученные изотермы сорбции аппроксимировались модифицированным уравнением Хилла, представляющим собой частный случай уравнения для описания кооперативных явлений в биологических системах:

$$A/(P/P_0) = [A/(P/P_0)]_{min} + [A/(P/P_0)]_{sat} Ch^N / (1 + Ch^N) \quad (1)$$

где $[A/(P/P_0)]_{min}$ – сродство полимера ниже порога по гидратации, равное сродству в высушенном состоянии, $[A/(P/P_0)]_{sat}$ – сродство ПНАГАА при бесконечно высокой гидратации, N – параметр кооперативности, C – константа связывания. В табл. 1 приведены полученные параметры, но вместо константы связывания C приведена величина пороговой гидратации, соответствующая влажности полимера на полувысоте изотермы, рассчитанная по уравнению $h_{thr} = \exp(-(\ln C)/N)$.

Табл. 1. Аппроксимационные параметры изотерм сорбции паров органических соединений в трехкомпонентных системах с гидратированным ПНАГАА при 298 К, рассчитанные по уравнению (1).

Сорбат	$[A/(P/P_0)]_{min}$ ммоль/г	$[A/(P/P_0)]_{sat}$ ммоль/г	N	h_{thr} г/г	δ^a
MeCN	2.0 ^b	3.1	3.0	0.25 ^c	0.06
EtOH	2.3 ^b	4.2	2.4	0.14	0.05
1- PrOH	0.47	2.4	5.0	0.12	0.02
2- PrOH	0.19	2.8	5.0	0.13	0.02
Диоксан	0.12	3.3	5.8	0.21	0.01
Бензол	0 ^d	0.71	6.9	0.16	0.03
c-C ₆ H ₁₂	0 ^d	<0.054	4.0	0.14	0.08

^aСтандартное отклонение для нормализованного наикратчайшего расстояния между экспериментальными точками и теоретической кривой. ^bСреднее значение сорбционного сродства $A/(P/P_0)$ для между первыми тремя экспериментальными точками с наименьшей гидратацией. ^cОценено с большой ошибкой (~40%). ^dСорбции в пределах ошибки эксперимента не обнаружено.

Сходство в форме изотерм сорбции для ПНАГАА и САЧ предполагает и одинаковый механизм связывания сорбатов в этих системах. Как уже говорилось, для белков им является клатратообразование. Сопоставление коэффициентов активности диоксана, бензола и циклогексана в воде показало, что селективность гидратированного полимера к паре бензол/циклогексан, рассчитанная как отношение соответствующих величин $[A/(P/P_0)]_{sat}$ (табл. 1), равна 13, что сравнимо с селективностью чистой

жидкой воды (отношение коэффициентов активности этих сорбатов в воде равно 33). Однако сравнение селективностей ПНАГАА и воды к паре диоксан/бензол (4.6 и 461, соответственно) представляет полимер как гораздо более гидрофобную жидкую среду. Это противоречие можно объяснить, если предположить клатратообразующий механизм связывания гидратированным полимером субстратов, поскольку известно, что селективность клатратообразования зависит от комплементарности субстрата рецептору.

Наблюдаемый порог по гидратации при связывании “плохих” пластификаторов согласуется с имеющимися в литературе данными об антипластификации полиамидов водой при низких гидратациях, которая сохраняет полимер в стеклообразном состоянии. При гидратациях ниже пороговых, в ПНАГАА содержится менее одной молекулы воды на один мономер, имеющий две протоноакцепторные группы. При таких соотношениях вода не разрушает существующую в ПНАГАА, который имеет избыток протоноакцепторных групп, сетку водородных связей, стабилизирующую стеклообразное состояние изученного полимера и препятствующую связыванию крупных сорбатов. Однако при достижении пороговой гидратации, полимерная цепь ПНАГАА, вероятно, становится достаточно гибкой для того, чтобы стало возможным связывание “плохих” сорбатов. Постоянство сорбционного сродства ПНАГАА при гидратациях выше пороговых свидетельствует о вторичной антипластификации полимера в изученных трехкомпонентных системах. Следовательно, можно говорить о фазовом переходе полимера в области пороговой гидратации из одного стеклообразного состояния в другое, обладающее более высоким сродством к изученным сорбатам.

Влияние “водоподобного” органического соединения на сорбционные свойства ПНАГАА

Для лучшего понимания роли воды в биоподобном поведении полимера как рецептора в настоящей работе было изучено влияние “водоподобных” органических растворителей этанола и ацетонитрила на сорбцию “плохих” растворителей диоксана и бензола высушенным ПНАГАА.

Было обнаружено, что, так же как и в случае с САЧ, этанол и ацетонитрил увеличивают сорбционное сродство ПНАГАА к бензолу и диоксану без заметного порога по активности или содержанию, рис. 6. При этом их влияние на сорбционное сродство к диоксану сравнимо с влиянием воды, а в случае с бензолом даже в несколько раз выше. Для САЧ активирующий эффект гидратации был значительно выше эффектов этанола и ацетонитрила. Видимо, это связано с большим вкладом пластификации полимера этанолом и ацетонитрилом в сравнении водой.

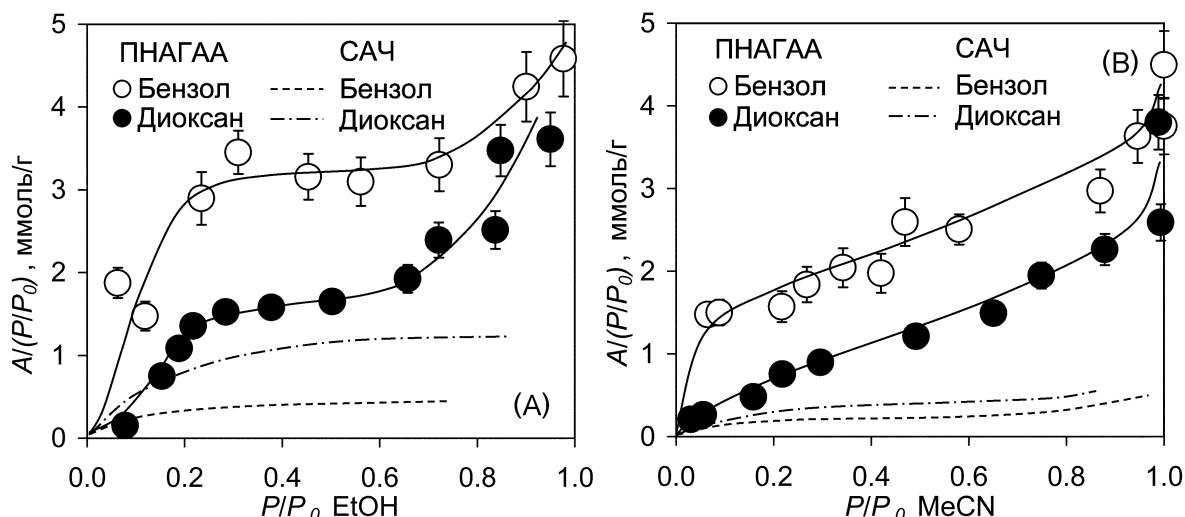


Рис. 6. Влияние этанола и ацетонитрила на сорбционное сродство $A/(P/P_0)$ высушенного ПНАГАА (0.013 h) к парам бензола при 298 К. Дозируемый жидкий раствор содержал 6 об. % бензола и 94 об. % ацетонитрила или этанола. Пунктирные линии представляют собой изотермы сорбции для САЧ (лит. данные).

Постоянное увеличение сорбционного сродства ПНАГАА к бензолу и диоксану с ростом активности ацетонитрила указывает на пластификацию полимера, рис. 6В. В системах с этанолом наблюдается участок насыщения сорбционного сродства ПНАГАА, подобный тому, что был получен ранее для альбумина, свидетельствующий об антипластификации, рис. 6А. При этом в тройных системах с этанолом обнаружен обратный кооперативный эффект бензола и диоксана на сорбцию полимером этанола в сравнении с его сорбцией в двухкомпонентной системе, рис. 7А, соответствующий дополнительному связыванию до 10 молекул этанола на 1 молекулу бензола или диоксана. Для ацетонитрила формы изотерм сорбции на ПНАГАА в трех- и двухкомпонентных безводных системах совпадали, что свидетельствует об отсутствии антипластификации в данных системах, рис. 7В.

В литературе существует мнение, что антипластификация полиамидов возможна лишь в том случае, если сорбат не разрушает сетку водородных связей, стабилизирующую стеклообразное состояние полимера. В ПНАГАА имеется недостаток протонодонорных групп, вследствие чего протоноакцепторный ацетонитрил, в отличие от этанола и воды, не способен выступить в качестве антипластификатора. В результате этого, в трехкомпонентных системах с двумя органическими сорбатами биоподобное поведение ПНАГАА наблюдается только в системах с этанолом.

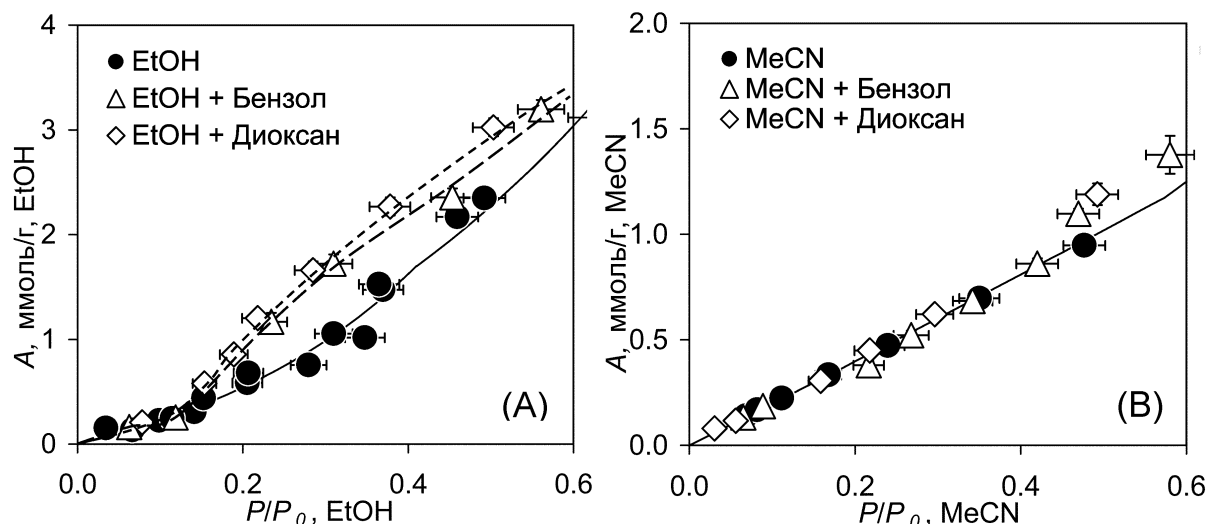


Рис. 7. Влияние диоксана и бензола на сорбцию паров этанола (А) и ацетонитрила (В) высушенным ПНАГАА (0.013 h) при 298 К. Дозируемый жидкий раствор содержал 6 об. % бензола или диоксана и 94 об. % этанола.

Обнаруженные в трехкомпонентных системах с ПНАГАА кооперативные эффекты проиллюстрированы с помощью структурной схемы на рис. 8. На этом рисунке состояние А соответствует высушенному сшитому гидрофильному полимеру, обладающему сильным эффектом исключения сорбата по объему. При гидратациях ниже порогового уровня полимер находится в антипластифицированном состоянии В, в котором он обладает низким сродством к “плохим” сорбатам. Дальнейшая гидратация приводит к кооперативному росту сорбционного сродства полимера к “плохим” сорбатам и, вероятно, к воде за счет стабилизации сетки водородных связей в гидратированном полимере “плохим” сорбатом, заполняющим в этой сетке потенциально пустые участки ограниченного размера (процесс В-С). Процесс А-Д при низком содержании этанола (<0.05 молекул этанола на мономер) дает частично пластифицированное состояние полимера, в котором положения молекул этанола и “плохого” сорбата независимы. Относительное расположение этих сорбатов, вероятно, становится зависимым при более высоком содержании этанола, когда приходится до одной молекулы этанола на два мономерных остатка (процесс D-E). В этих условиях происходит увеличение сорбции полимером этанола, вызванное присутствием малых количеств “плохих” сорбатов диоксана и бензола, которое, вероятно, приводит к стабилизации сетки водородных связей в системе полимер-этанол.

Подобная схема применима также для описания кооперативных взаимодействий β -лактоглобулина, коллагена и ранее изученного альбумина с водно-органическими смесями. Для альбумина данную схему можно применить и для описания взаимодействий с двумя органическими компонентами, за исключением состояния D, поскольку обратный кооперативный

эффект плохих сорбатов на сорбцию этанола альбумином начинается при более низких активностях этанола.

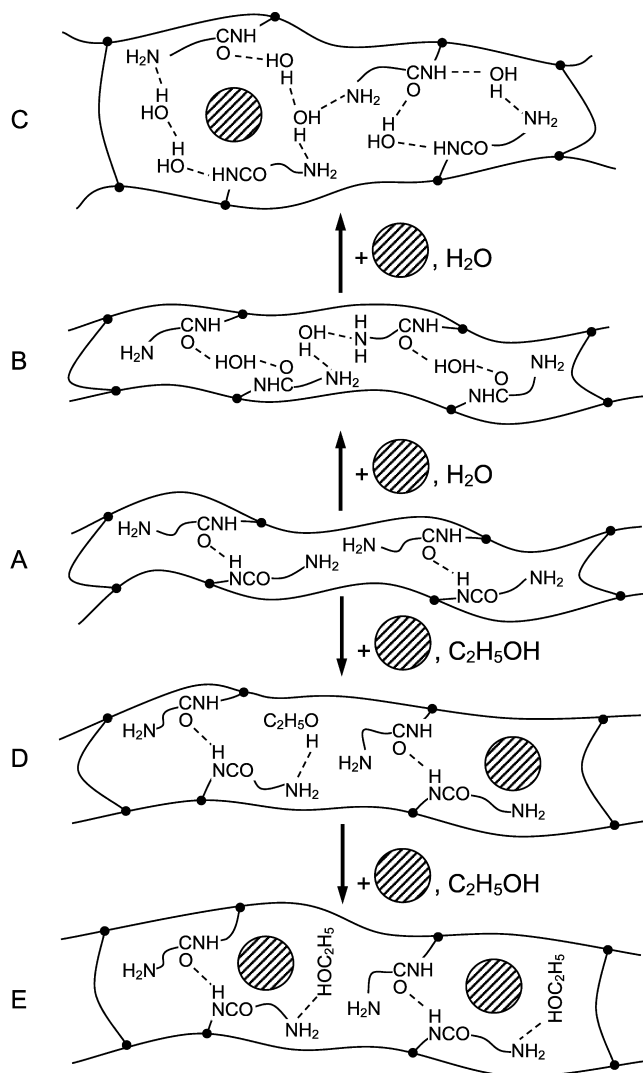


Рис. 8. Схематическое изображение биоподобного кооперативного влияния гидратации и влияния этанола на связывание “плохого” сорбата (субстрата) поли-N-6-аминогексилакриламидом. (А) высушенный ПНАГАА; (В) ПНАГАА, гидратированный ниже порогового уровня, когда на один мономер приходится менее одной молекулы воды; (С) гидратированный ПНАГАА, в котором на две протоноакцепторных группы приходится более одной молекулы воды, когда “плохой” сорбат (субстрат) заполняет потенциально пустые участки в сетке водородных связей; (D) частично пластифицированный ПНАГАА, с содержанием этанола менее одной молекулы на двадцать мономерных остатков, когда молекулы “плохого” сорбата связывается независимо от этанола; (Е) ПНАГАА, содержащий менее одной молекулы этанола на два мономерных остатка, когда молекулы “плохого” сорбата заполняют потенциально пустые участки в сетке водородных связей полимера.

нола на два мономерных остатка, когда молекулы “плохого” сорбата заполняют потенциально пустые участки в сетке водородных связей полимера.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые изучено влияние температуры на сорбцию органических соединений гидратированными белками. Для β -лактоглобулина и коллагена обнаружено, что при увеличении температуры от комнатной (298 К) до физиологической (309.5 К) происходит уменьшение порога гидратации, выше которого наблюдается эффективное связывание органических субстратов этими белками.

2. Впервые изучено влияние примесей липидов на сорбционные свойства высушенного и гидратированного белка. Обнаружен синергизм во влиянии гидратации и примесей липидов, присутствующих в β -лактоглобулине, на кооперативный рост его сорбционного сродства к углеводородам.
3. Впервые получены изотермы сорбции, характеризующие зависимость сорбционного сродства полимера к органическим соединениям от степени его гидратации в отсутствие жидкой фазы. Обнаружено биоподобное кооперативное влияние гидратации на сорбционное сродство сшитого поли-N-6-аминогексилакриламида по отношению к крупным сорбатам.
4. В трехкомпонентных системах с участием сшитого поли-N-6-аминогексилакриламида и двух летучих органических компонентов обнаружено биоподобное кооперативное влияние “плохих” пластификаторов на сорбцию этанола полимером.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:

1. Mironov N.A. Effects of hydration, of lipids and of temperature on the binding of the volatile aroma terpenes by beta-lactoglobulin powders / N.A. Mironov, V.V. Breus, V.V. Gorbachuk, B.N. Solomonov, T. Haertle // J. Agric. Food Chem. – 2003. – V.5, N4. – P.2665-2673.
2. Gorbachuk V.V. Biomimetic cooperative interactions of dried cross-linked poly(N-6-aminohexylacrylamide) with binary mixtures of solvent vapors / V.V. Gorbachuk, N.A. Mironov, B.N. Solomonov, W.D. Habicher // Biomacromolecules. – 2004. – V.5.- P.1615-1623.
3. Миронов Н.А. Сопоставление супрамолекулярных свойств производного полиакриламида и сывороточного альбумина человека / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук, Б.Н. Соломонов // Тез. докл. I Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. - Казань, 20-21 октября 2000. - С.62.
4. Миронов Н.А. Влияние гидратации, температуры и примесей липидов на рецепторные свойства твердого β -лактоглобулина / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук, Б.Н. Соломонов // Тез. докл. II Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. - Казань, 5-6 декабря 2001. - С.58.
5. Миронов Н.А. Биоподобность сорбционных свойств поли-6-аминогексилакриламида / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук, Б.Н. Соломонов // Тез. докл. XIV Международной конференции по химической термодинамике. - Санкт-Петербург, 1-5 июля 2002. - С.433.

6. Mironov N.A. Effect of hydrophobic hydration on binding properties of poly(acrylic acid 6-aminohexylamide) / N.A. Mironov, V.V. Gorbachuk, V.V. Breus, B.N. Solomonov, W.D. Habicher // Abstracts of the second international symposium: Molecular design and synthesis of supramolecular architectures. - Kazan, Russia, 27-31 August, 2002. - P.83.
7. Миронов Н.А. Биоподобность рецепторных свойств поли-6-аминогексилакриламида / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук, Б.Н. Соломонов, В.Д. Хабишер // Тез. докл. III Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века". - Казань, 14-15 февраля 2003. - С.57.
8. Миронов Н.А. Роль гидрофобной гидратации в биоподобности рецепторных свойств сшитого гидрофильного полимера / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук // Тез. докл. II Междисциплинарной конференции НБИТТ-21. - Петрозаводск, Россия, 23-25 июня 2003 г. - С.69.
9. Миронов Н.А. Влияние гидратации, температуры и примесей липидов на сорбционные свойства твердого β -лактоглобулина / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук, Б.Н. Соломонов // Тез. докл. XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Достижения и перспективы химической науки, Т. 1. - Казань, 21-26 сентября 2003 г. - С. 73.
10. Миронов Н.А. Роль гидратации в функционировании биоподобного полимера как рецептора / Н.А. Миронов, В.В. Горбачук, Б.Н. Соломонов // Тез. докл. XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Материалы и нанотехнологии, Т.3. - Казань, 21-26 сентября 2003 г. - С.283.
11. Gorbachuk V.V. Thermodynamic criteria of biomimic properties of supramolecular receptors / V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin, N.A. Mironov // Тез. докл. XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Российско-французский симпозиум "Супрамолекулярные системы в химии и биологии", Т.4. - Казань, 21-26 сентября 2003 г. - С. 27.
12. Gorbachuk V.V. Biomimic receptor properties of the cross-linked hydrophilic polymer without imprinting / V.V. Gorbachuk, N.A. Mironov // Abstract of the second international symposium "Reactive polymers in inhomogeneous systems, in melt and the interfaces". - Dresden, Germany 28 September – 1 October, 2003. - L15.